

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

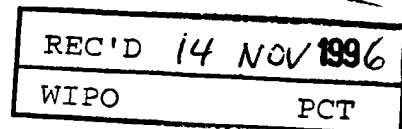
- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

0 9/068, 751

**Bescheinigung****PRIORITY DOCUMENT**

Herr Dr. Wolfgang-M. F r a n z in Heidelberg/Deutsch-  
land hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Vektor-System für die Gentherapie am Herz-  
muskel"

am 17. November 1995 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Der Wohnort des Anmelders wurde geändert in:  
Groß Grönau/Deutschland.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wie-  
dergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmel-  
dung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die  
Symbole C 12 N und A 61 K der Internationalen Patentklas-  
sifikation erhalten.

München, den 24. April 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Holß

Aktenzeichen: 195 42 838.2

17.11.95



1

## Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein neues Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Das neue Vektor-System ist durch einen viralen oder nicht viralen Genshuttle gekennzeichnet, in dem ein therapeutisches Gen, gekoppelt an den ventrikulären MLC-2-Promotor, einkloniert ist.

17.11.95

3

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein neues Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Es gibt verschiedene Formen der Kardiomyopathie. Ihr Krankheitsbild umfaßt eine Gruppe von Herzmuskelerkrankungen, welche sich sowohl in kontraktile als auch in elektrophysiologischen Störungen präsentieren und letztlich zur schweren Herzinsuffizienz und/oder zum plötzlichen, elektrophysiologischen Herztod führen. Die Suche nach monogenetischen Ursachen bei familiären Formen der dilatativen und hypertrophen Kardiomyopathien ist derzeit Gegenstand zahlreicher grundlagenwissenschaftlicher und klinischer Untersuchungen. So konnten gerade in jüngster Zeit genetische Ursachen für Herzmuskelerkrankungen auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Zudem ergibt sich aus dem Einsatz von molekularbiologischen Methoden ein neues Verständnis für molekulare Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz und der Kardiomyopathie. Nach Identifizierung genetischer Defekte und dem Nachweis einer veränderten Genexpression in erkrankten Herzmuskelgeweben ergibt sich die Möglichkeit, bestimmte molekulare Veränderungen durch Übertragung von genetischem Material zu korrigieren bzw. zu kompensieren. Der bereits in der Krebstherapie und kürzlich auch bei der Muskeldystrophie angewandte Transfer von Fremdgenen in somatische Zellen des intakten Organismus stellt daher eine vielversprechende Methode dar, welche möglicherweise als gentherapeutisches Verfahren auch in der interventionellen Kardiologie eingesetzt werden könnte. Die am häufigsten für den somatischen Gentransfer verwendeten Vehikel sind die nicht replikationsfähigen Retroviren. Voraussetzung für eine erfolgreiche retrovirale Infektion ist jedoch eine teilungsfähige Zielzelle, wie zum Beispiel stark proliferierende Tumorzellen. Da eine Vielzahl somatischer Zellen einschließlich der Kardiomyozyten nicht mehr teilungsfähig sind, können retrovirale "Shuttle-Vektor" Systeme hier nicht verwendet werden.

17.11.95

4

Unter den verfügbaren Gentransfersystemen haben die rekombinanten Adenoviren verschiedene Eigenschaften, die sie für den somatischen Gentransfer in teilungsunfähige Zellen besonders attraktiv machen.

Große Beachtung fand daher eine erst jüngst von Perricaudet und Rosenfeld entwickelte Technik des stabilen Gentransfers in Bronchialepithelien zur Therapie der zystischen Fibrose mittels rekombinanter Adenoviren. Diese Methode konnte von der Arbeitsgruppe Perricaudet auf teilungsunfähige Herz- und Skelettmuskelzellen der Maus übertragen werden. Therapeutisch wurde das adenovirale Gentransfersystem bereits an der Skelettmuskulatur eingesetzt, um das bei der progressiven Muskeldystrophie vom Typ Duchenne fehlende Dystrophingen zu ersetzen. So zeigen nach intramuskulärer Virus-Applikation bis zu 50% der Skelettmuskelfasern eine mittels Immunhistochemie nachweisbare Expression des Dystrophinproteins.

Da bereits einige Formen der dilatativen Kardiomyopathie mit defektem Dystrophinprotein bzw. fehlendem Dystrophingen beschrieben wurden könnte sich aus diesen Vorkenntnissen ein Ansatz zur spezifischen Gentherapie der Dystrophinopathie am Herzmuskel ergeben.

Das humane Adenovirus gehört zu der Klasse der doppelsträngigen DNA-Viren mit einem Genom von ca. 36 Kilobasenpaaren (Kb). Die virale DNA kodiert für etwa 2700 verschiedene Genprodukte, wobei man frühe ("early genes") und späte ("late genes") Genprodukte in Bezug auf den adenoviralen Replikationszyklus unterscheidet. Die "early genes" werden in vier transkriptionelle Einheiten, E1 bis E4, unterteilt. Die späten Genprodukte kodieren für die Kapsidproteine. Immunologisch können mindestens 42 verschiedene Adenoviren unterschieden werden. Die zelluläre Aufnahme der Adenoviren erfolgt über den Mechanismus der Rezeptorvermittelten Endozytose in das lysosomale Kompartiment einer Vielzahl humaner Zelltypen. Danach wandert das adenovirale Genom ins Zytoplasma und anschließend zum Zellkern. Die Transkription der viralen Gene setzt die Expression der "early region 1" voraus, welche für einen Transaktivator der adenoviralen Genexpression kodiert.

17.11.95

5

Diese Abhängigkeit der Expression aller nachfolgenden viralen Gene von dem El-Transaktivator kann für die Konstruktion der nicht replikationsfähigen adenoviralen Vektoren genutzt werden.

In adenoviralen Vektoren wird die El-Genregion durch ein Fremdgen mit eigenem Promotor ersetzt. Durch den Austausch der El-Genregion, welche für die Expression der nachgeschalteten adenoviralen Gene Voraussetzung ist, entsteht ein nicht replikationsfähiges Adenovirus. Diese Viren können sich dann nur in einer Zelllinie vermehren, welche die fehlenden El Gene ersetzt. Replikationsdefiziente Adenoviren werden daher durch homologe Rekombination in der sogenannten 293 Zelllinie (humane embryonale Nierenzelllinie), die eine Kopie der El Region stabil im Genom integriert hat, gebildet. Hierzu werden unter Kontrolle eines eigenen Promotors (z.B. RSV) Fremdgene (z.B.  $\beta$ -Galaktosidase) in rekombinante adenovirale Plasmide kloniert. Anschließend erfolgt die homologe Rekombination zwischen den Plasmiden pAd.RSV/ $\beta$ -Gal und dem El-defizienten adenoviralen Genom dl327 (Adenovirus 5) in der Helferzelllinie 293. Bei erfolgreicher Rekombination werden virale Plaques geerntet. Die so erzeugten, replikationsdefizienten Viren werden dann in hohen Titern ( $10^8$  bis  $10^{11}$  Plaque bildende Einheiten) zur Infektion der Zellkultur oder der Tiere eingesetzt. Die Größe eines rekombinanten adenoviralen Genoms ist auf ca. 38 bis 40 Kb beschränkt und muß bei der Konstruktion der adenoviralen Shuttle-Vektoren unbedingt berücksichtigt werden.

Mittels intravenöser (i.v.) Applikation von rekombinanten Adenoviren wurde das beschriebene  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen unter Kontrolle des retroviralen Promotors (RSV) bis zu 12 Monaten bereits stabil in muskulären Geweben exprimiert. Detaillierte Untersuchungen der Gewebeverteilung nach i.v. Applikation von rekombinanten Adenoviren mit Luciferase als Reportergen ergaben, daß in allen untersuchten Geweben Luciferase-Aktivität nachweisbar war.

Quantitativ zeigte sich jedoch eine präferenzielle Luciferase-Expression in der Leber (99%) der i.v. infizierten Tiere.

17.11.95

7

6

Zusätzliche Untersuchungen mit  $\beta$ -Galaktosidase produzierenden Adenoviren ergaben, daß ca. 90% aller Leberparenchym- und -endothelzellen das Fremdgen effektiv exprimierten. Im Gegensatz hierzu kommt es bei der Verwendung des CMV-Promotors zu einer raschen Abnahme der Genexpression in der Leber. Daraus wird ersichtlich, daß bei dem Gentransfer in bestimmte Zielzellen nicht nur die Methode der viralen Applikation, sondern auch die Auswahl des für die stabile Expression wichtigen Promotors von entscheidender Bedeutung ist. Hinzu kommt die Immunantwort des Empfängerorganismus, die bei der i.v. Applikation zur Ausbildung hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern gegen Kapsidproteine führt. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß unter Umständen der wiederholte Gentransfer mit rekombinanten Adenoviren zu einer erheblichen Abnahme der Transferrate führen kann.

Für die Herzmuskulatur wurde erst kürzlich von der Arbeitsgruppe Leiden ein stabiler Gentransfer durch direkte Infusion von  $2 \times 10^9$  replikationsunfähigen Adenoviren in die Koronararterien von Kaninchen erzielt. Mit diesem sogenannten "Percutaneous Coronary Gene Transfer" (PCGT) Verfahren war unter Kontrolle des CMV-Promotors sowohl in endothelialen als auch glatten Muskelzellen der Gefäße und in den ventrikulären Herzmuskelzellen eine Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens nachweisbar. Die aufgezeigten Untersuchungen weisen darauf hin, daß grundsätzlich verschiedene Zelltypen mittels intrakoronarer Infektion erreicht werden können. Für eine gezielte Expression wäre ein gewebespezifischer Promotor von großem Nutzen. Für die Therapie von Herzmuskelerkrankungen ist vor allem die gezielte kardiomyozytäre Expression von Interesse.

17.11.95

7

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß adenovirale Vektoren für den Gentransfer verschiedene Vorteile haben: ihre Unabhängigkeit von der Wirtszellreplikation, ihre Fremd-DNA-Verpackungskapazität von bis zu 7,5 kb, der hoch effiziente Gentransfer und ihr großes Wirtsspektrum. Ihre Fähigkeit, verschiedene Zelltypen zu infizieren, kann jedoch zur Expression von vermeintlichen therapeutischen Genen in nicht Zielzellen und damit unerwünschten Risiken führen.

Es ist bisher u.a. noch nicht gelungen, Adenoviren so zu verändern, daß sie für spezifische Expressionen in somatischen Zellen (z.B. Herzmuskelzellen) verwendbar sind. Ihr Einsatz für einen Gentransfer in Herzmuskelzellen für eine Therapie konnte deshalb bisher aus Sicherheitsgründen nicht in Betracht gezogen werden.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein adenovirales Shuttle-Vektor-System mit gezielter, möglichst ausschließlicher Expressionsaktivität in Herzmuskelzellen zu entwickeln. Auf der Basis dieses Systems sollte ein Therapiekonzept für monogenetische Formen der Kardiomyopathien aufgebaut werden, welche maximale Sicherheit vor einer Expression in Zellen außerhalb des Herzmuskels bietet.

Teilziele sind die Klonierung eines herzmuskelspezifischen Promotors in das adenovirale System sowie die Untersuchung der Spezifität, Stabilität und Effizienz der Genexpression mit Hilfe der Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergene.

Es wurde gefunden, daß der MLC-2 Promotor (Myosin-Leicht-Kette-2-Promotor) in den adenoviralen Kontext, überraschend gewebe-spezifisch ist. Darauf ist die vorliegende Erfindung aufgebaut, die gemäß den Ansprüchen 1, 6 und 7 realisiert wird. Die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.



17.11.95

9

8

Das erfindungsgemäße Vektor-System ist durch einen viralen oder nicht viralen Genshuttle gekennzeichnet, in den ein therapeutisches Gen, gekoppelt an den ventrikulären MLC-2-Promotor, einkloniert ist.

Bevorzugt wird ein Vektor-System, das dadurch gekennzeichnet ist, daß als Basis für den Genshuttle ein Adenovirus eingesetzt wird.

Besonders bevorzugt ist ein Vektor-System, in dem ein rekombinationsdefizienter Adenovirus eingesetzt wird.

Als therapeutisches Gen wird die cDNA eines Gens verwendet, das bei der zu behandelnden Krankheit qualitativ und quantitativ verändert ist.

Die Erfindung läßt sich auch realisieren, wenn Teile oder Varianten des MLC-2-Promotors eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Vektor-System wird hergestellt, indem in einem adenoviralen Vektor die El-Genregion oder eine andere Region durch ein therapeutisches Gen mit dem MLC-2-Promotor ersetzt wird.

Die Anwendung des neuen Vektor-Systems erfolgt bevorzugt dadurch, daß das Vektor-System konfektioniert und einem Patienten über die Blutbahn, vorzugsweise über ein modifiziertes Kathederverfahren in das arterielle oder venöse Koronarsystem appliziert wird.

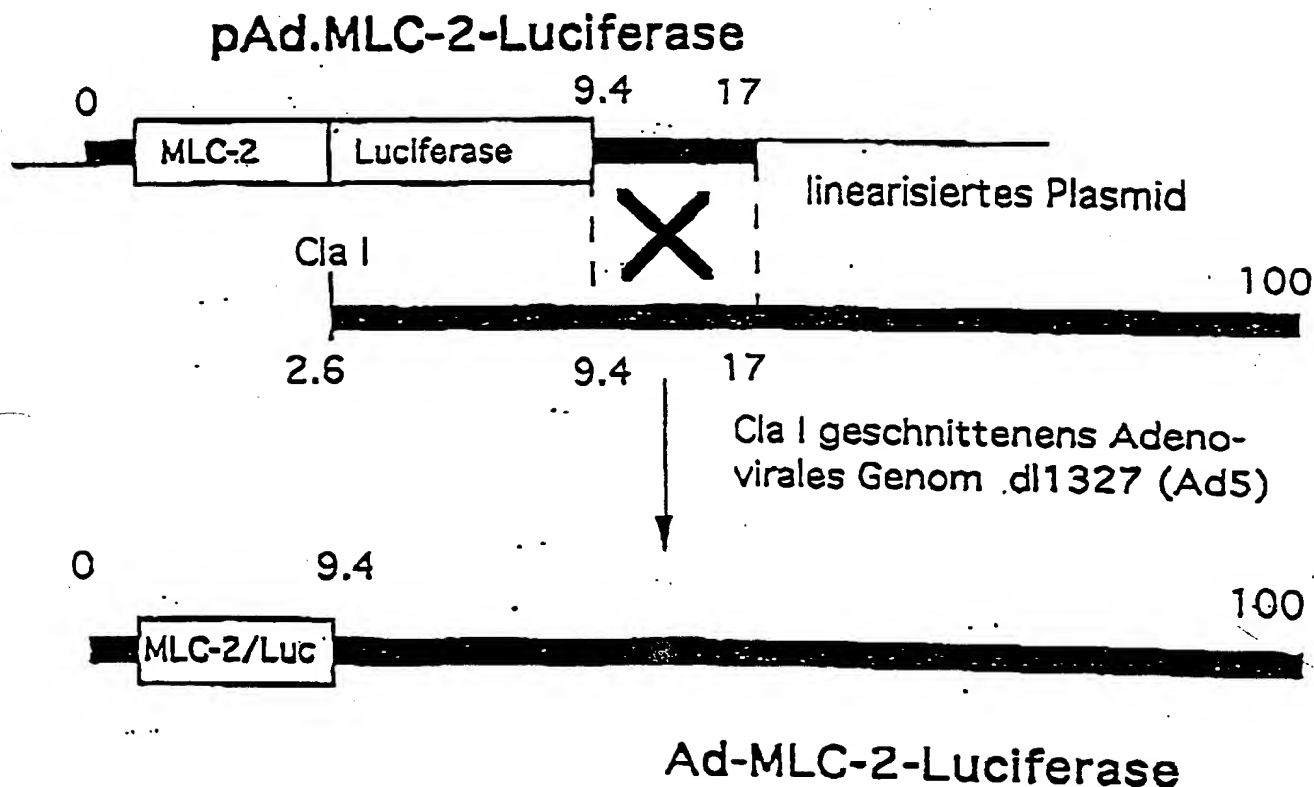
Die Erfindung soll nachfolgend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

1. Zur Etablierung des Somatischen Gentransfers mit adenoviralen "Shuttle-Vektoren" werden rekombinante Adenoviren mit Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Reportargenen unter Kontrolle des MLC-2 Promotors nach folgendem Schema erzeugt:

17.11.95

9

10



**Abbildung:** Erstellung des rekombinanten Adenovirus Ad-MLC-2-Luciferase mittels in vivo Rekombination.

**Ad a) Klonierung des rekombinanten Plasmides pAd.MLC-2/Luciferase:**

Das in ... beschriebene MLC-2/Luciferase Fusionskonstrukt wird an den Restriktionsschnittstellen Kpn I aus dem "Bluescript"-Plasmid herausgeschnitten. In einer anschließenden sogenannten "Klenow"-Reaktion werden die überhängenden Enden aufgefüllt und durch Zugabe von sogenannten Pvu II-Linkern zusätzliche Restriktionsenzymchnittstellen an beiden Enden angebracht. Dieses 4.0 kB lange MLC-2/Luciferase-DNA Fragment wird dann in Analogie zu dem rekombinanten Plasmid pAd.RSV $\beta$ gal in die Pvu II-Schnittstelle am 3'-Ende der 1.3 mu (1 mu = 360 bp) Region des Adenovirus Typ 5 (Ad 5) Genoms gekoppelt.

17.11.95

M

10

An das Luciferase-Reportergen schließt sich das 9.4-17 mu lange DNA-Fragment von Ad 5, welches für die homologe Rekombination mit dem adeno-viralen Genom zur Bildung der rekombinanten Adenoviren notwendig ist, an. Die korrekte Orientierung des Fusionskonstrukts wird mittels Restriktions-enzymen und Sequenzierung überprüft.

Ad b) Erstellung der rekombinanten Adenoviren Ad-MLC-2-Luciferase:

Das rekombinate Adenovirus entsteht in vivo durch homologe Rekombination in der 293 Zelllinie zwischen dem neu konstruierten Plasmid pAd.MLC-2/Luciferase und der adeno viralen DNA Ad dl327. Hierzu werden die 293 Zellen mit 5 µg des linearisierten Plasmids pAd.MLC-2/Luciferase und 5 µg des 2.6-100 mu (1 mu = 360 bp) langen Cla I Fragmentes von Adenovirus 5 (Ad 5) kotransfiziert. Nach Überschichtung der Zellen mit Agar und 10-tägiger Inkubation bei 37°C werden rekombinante adenovirale Plaques isoliert und auf ihre Luciferaseaktivität hin überprüft. Die rekombinanten Adenoviren werden in der 293 Zelllinie vermehrt und mittels Cäsiumchloridgradienten zentrifugiert. Die viralen Überstände werden dann unter Verwendung der 293 Zelllinie im Plaqueassay austitriert.

Ad c) In vitro und in vivo Infektion von Kardiomyozyten:

Isolierte, neonatale Rattenkardiomyozyten werden mit diesen rekombinanten Adenoviren, Ad-MLC-2-Luciferase, in der Zellkultur infiziert und auf die Luciferaseexpression hin untersucht. Bei erfolgreicher in vitro Expression der Luciferase werden anschließend Ratten mit 20-40 µl von gereinigten, rekombinanten Adenoviren ( $10^{11}$  Plaque-formierende Einheiten/ml) über intravenöse Injektion, später auch über "Percutaneous Coronary Gene Transfer"  $2 \times 10^8$  infektiöse Partikel in die Koronararterien eingebracht.

17.11.95

12

Ad d) Nachweis der Luciferase-Expression im Luciferase-Assay:

Für den Luciferase-Assay werden gesamtzelluläre Proteinextrakte aus den infizierten Kardiomyozyten- und Fibroblastenkulturen oder später aus infizierten Herzmuskelgewebe hergestellt. Bei erfolgreicher Infektion und aktivem MLC-2 Promotor befindet sich intaktes Luciferase-Enzym im Zellextrakt. Durch Zugabe der Substrate Luciferin und ATP entsteht unter Abspaltung von Pyrophosphat ein Komplex aus Luciferase-Luciferyl-AMP.

Durch Oxidation von Luciferyl kommt es zur Dissoziation von Oxiluciferin, AMP und CO<sub>2</sub> unter Aussendung eines Lichtquants mit der Wellenlänge 560 nm. Diese Lichtemission wird in einem Transilluminometer photometrisch in Lichteinheiten (LU) registriert und auf die Proteinmenge bezogen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den folgenden 5 Abbildungen dargestellt.

17-11-95 01:22

17.11.95

## 2. Infection of tissue culture cell lines

adenovirus Ad-m1Luc is „transcriptionally silent“ in all investigated cell lines in terms of luciferase expression

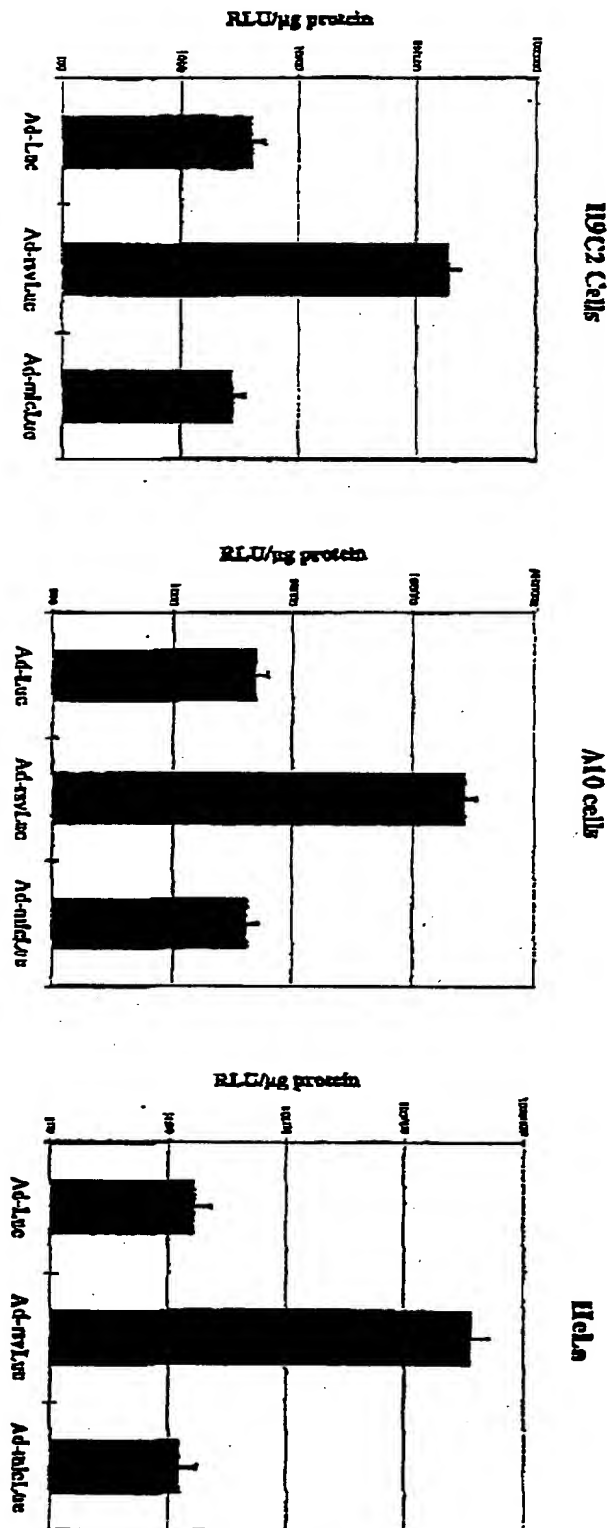
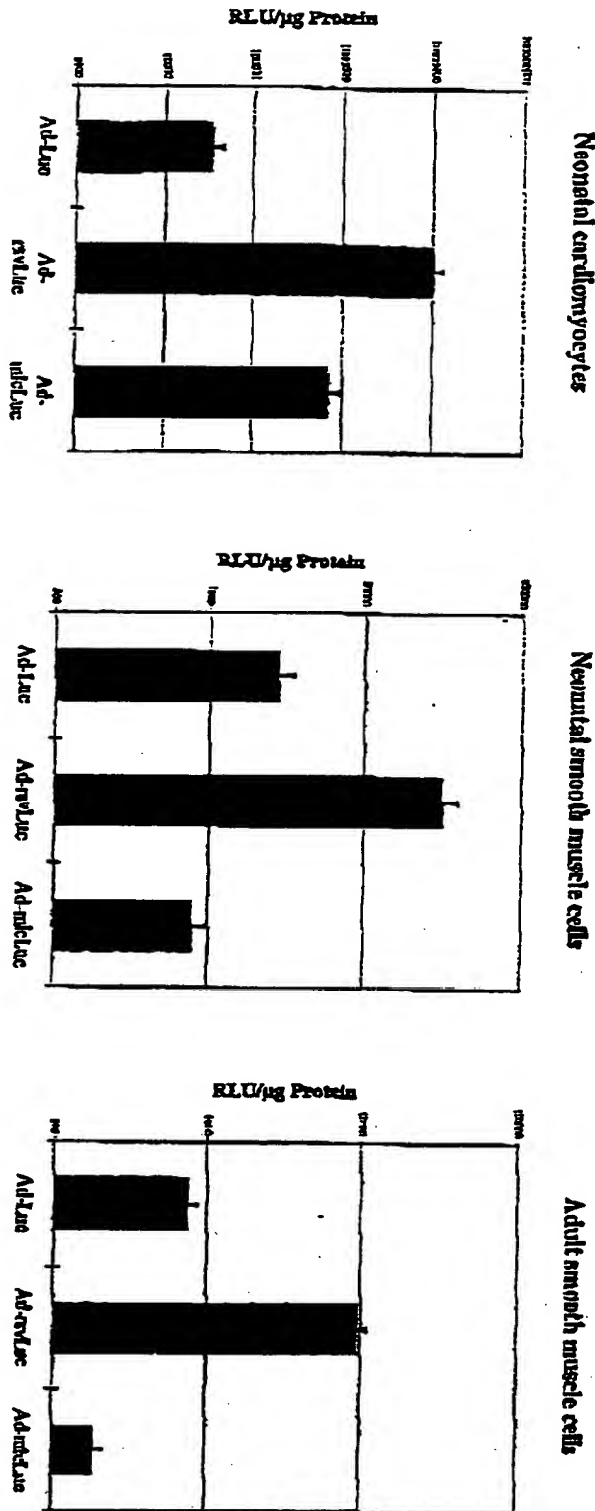


Fig.2.: Quantitative illustration of luciferase expression (Relative Light Units RLU/ $\mu$ g protein) with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-m1Luc and Ad-m1Luc in H9C2 cells (heart myoblast, rat), A10 cells (smooth muscle cells, rat) and HeLa cells (cervical carcinoma, human). Three days post infection (m.o.i. 10) luciferase assay wurde done according to standart procedures. Luciferase expression of Ad-m1Luc infected cell lines were lower as the negative control Ad-Luc. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standart error of the mean..

17.11.95

### 3. Infection of primary cells in tissue culture

#### • adenovirus Ad-mLuc specifically expresses luciferase in neonatal cardiomyocytes in vitro



**Fig.2:** Quantitative illustration of luciferase expression (Relative Light Units RLU/ $\mu$ g protein) with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-mLuc and Ad-mLuc in primary neonatal cardiomyocytes (nm), primary neonatal and adult smooth muscle cells (sm). Cardiomyocytes were infected two days after preparation from two-three days old animal, smooth muscle cells were infected at passage numbers 1-3. Three days post infection (m.o.i. 10) luciferase assay were done according to standard procedures. Luciferase expression of Ad-mLuc infected in cardiomyocytes was 8% of Ad-Luc and about 10-fold compared to Ad-Luc. In smooth muscle cells Ad-mLuc was about 0.25 of Ad-Luc. Each bar represents an arithmetic mean of four to five experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

#### 4. Intracardial infection of neonatal rats

- adenovirus Ad-m1cluc specifically expresses luciferase in the myocardium in vivo

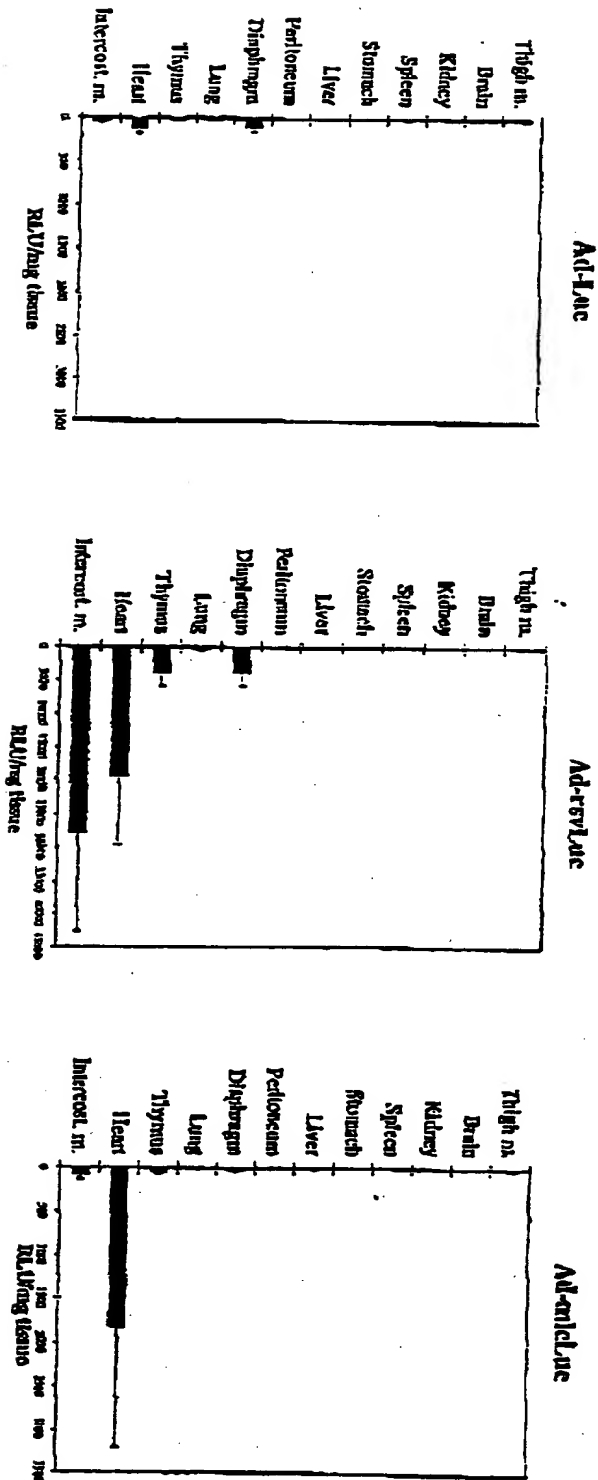


Fig.4.: Quantitative illustration of the transduction efficiency with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rvLuc and Ad-m1cluc. Five days after administration of  $1.5-1.8 \times 10^9$  plaque forming adenoviral particles in a 20  $\mu$ l volume into the left ventricle of the heart luciferase light units were determined. The transduction efficiency is expressed in Relative Light Units (RLU)/mg tissue in each of 12 different organs. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.

# 5. Intramuscular injection of recombinant adenoviruses into thigh muscle of neonatal rats

- adenovirus Ad-rsvLuc strongly expresses luciferase in the thigh muscle in vivo
- adenovirus Ad-mucLuc is "transcriptionally silent" in thigh muscle

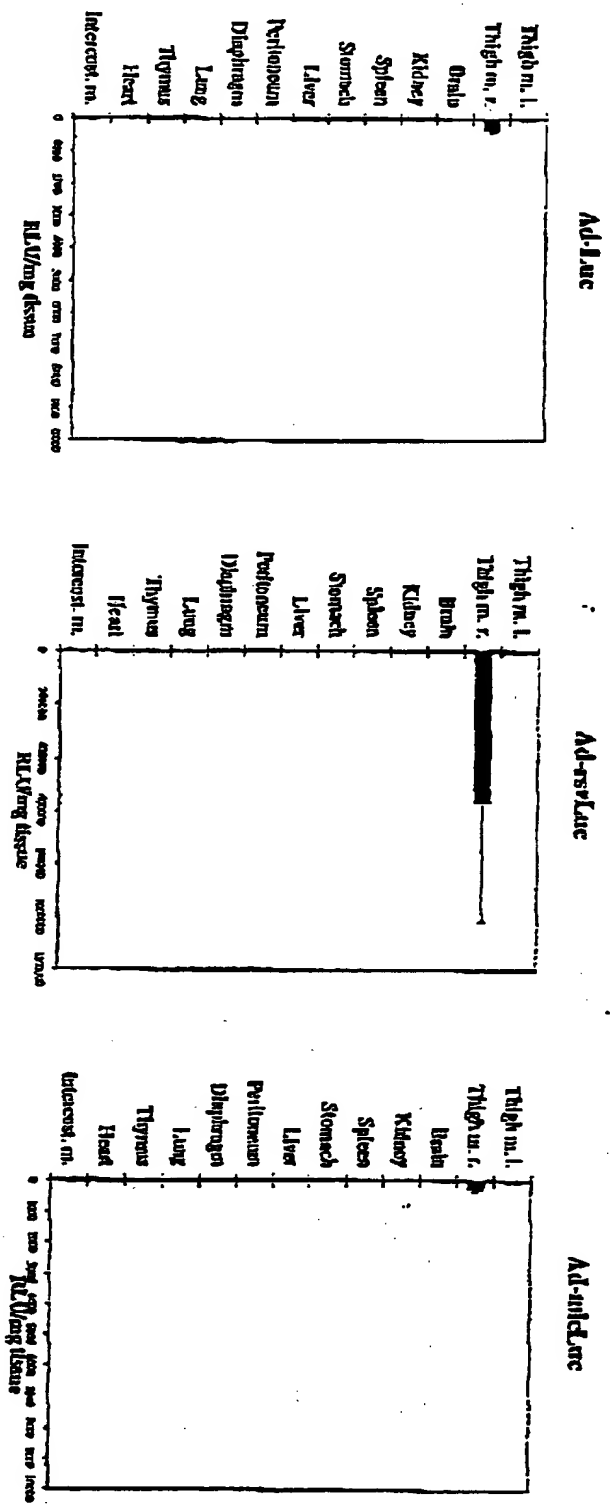


Fig.5.: Quantitative illustration of the transduction efficiency with the recombinant adenoviruses Ad-Luc, Ad-rsvLuc and Ad-mucLuc. Five days after administration of  $1.5 \times 10^8$  plaque forming adenoviral particles in a 20µl volume into the thigh muscle of the left hind leg luciferase light units were determined. The transduction efficiency is expressed in Relative Light Units (RLU)/mg tissue in each of 13 different organs. Each bar represents an arithmetic mean of four experiments and the thin bar indicates the standard error of the mean.



17.11.95

18

2

**Patentansprüche**

1. Vektor-System für die Gentherapie am Herzmuskel, gekennzeichnet durch einen viralen oder nicht viralen Genshuttle, in den ein therapeutisches Gen , gekoppelt an den ventrikulären MLC-2-Promotor, einkloniert ist.
2. Vektor-System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Basis für den Genshuttle ein Adenovirus eingesetzt wird.
3. Vektor-System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinationsdefizienter Adenovirus eingesetzt wird.
4. Vektor-System nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als therapeutisches Gen die cDNA eines Gens verwendet wird, das bei der zu behandelnden Krankheit qualitativ oder quantitativ verändert ist.
5. Vektor-System nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß Teile oder Varianten des MLC-2-Promotors eingesetzt werden.
6. Verfahren zur Herstellung des Vektor-Systems nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß in einem adenoviralen Vektor die El-Genregion oder eine andere Region durch ein therapeutisches Gen mit dem MLC-2-Promotor ersetzt wird.
7. Verfahren zur Anwendung des Vektor-Systems nach Anspruch 1-4, gekennzeichnet dadurch, daß das Vektor-System konfektioniert und einem Patienten über die Blutbahn, vorzugsweise über ein modifiziertes Kathederverfahren in das arterielle oder venöse Koronarsystem appliziert wird.